

李梦南, 郑广宏, 付小花, 等. 2009. 废弃重组质粒 DNA 热处理效率的环境影响因素 [J]. 环境科学学报, 29(6): 1190-1194

LIM N, Zheng G H, Fu X H, *et al*. 2009. The environmental factors affecting the efficiency of thermo-treatment for disposal of waste plasmid DNA [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(6): 1190-1194

废弃重组质粒 DNA 热处理效率的环境影响因素

李梦南¹, 郑广宏¹, 付小花¹, 乐毅全¹, 肖伟², 王磊^{1*}, 任大明²

1. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

2. 复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

收稿日期: 2008-07-16 修回日期: 2008-12-08 录用日期: 2009-03-31

摘要: 为了解环境因素对质粒 DNA 热处理效率的影响以及热处理过程的有效性和安全性, 以 pET-28b 质粒为材料, 采用定量 PCR 技术结合质粒转化等方法分析了 pH、NaCl 牛血清白蛋白 (BSA) 及 EDTA 浓度等因素对质粒 DNA 热处理的影响。结果表明, NaCl BSA 及 EDTA 的存在对热处理过程中的质粒 DNA 具有保护作用, 且保护作用依次增强。在纯水中热处理 30 min 后的质粒 DNA 可扩增的片段数仅是在 0.1% 的 EDTA 中热处理 30 min 后质粒 DNA 可扩增片段数目的 1.7%。由于生物实验室废水中通常含有上述有机或无机物质, 因此, 实际热处理过程中质粒 DNA 的降解半衰期可能远长于先前报道的 2~4 min, 残留的转化活性也可能更高, 这必须引起我们高度关注。但是, 研究结果也表明, 酸性条件下的热处理能加速质粒 DNA 的失活和降解, 因此建议热处理过程可在弱酸性条件下完成, 以强化其处理效果。

关键词: 热处理; 质粒 DNA; 降解; 转化; 环境因素; 定量 PCR

文章编号: 0253-2468(2009)06-1190-05 中图分类号: X171 文献标识码: A

The environmental factors affecting the efficiency of thermo-treatment for disposal of waste plasmid DNA

LIM engnan¹, ZHENG Guanghong¹, FU Xiaohua¹, LE Yiqian¹, XIAO Wei², WANG Lei^{1*}, REN Daming²

1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092

2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433

Received 16 July 2008 received in revised form 8 December 2008 accepted 31 March 2009

Abstract The main method for treating wastewater containing recombinant DNA from biological laboratories is heating at 100°C for 3~5 min. The treatment efficiency of the waste recombinant gene fragments can be interfered with by multiple factors, so it is important to figure out the impacts of different environmental factors on the decay efficiency of plasmid DNA during the thermo-treatment process. Plasmid pET-28b was used as an example to investigate the decay efficiency during the thermo-treatment process under different conditions including pH and different NaCl, bovine serum albumin (BSA) and EDTA concentrations. Quantitative PCR plus plasmid transformation technology were used to measure the effectiveness of the treatment. The experimental results showed that low pH conditions promote the decay of plasmid DNA during the thermo-treatment process. NaCl, BSA and especially EDTA all protect the DNA from being degraded. The number of template copies of plasmid DNA remaining after thermo-treating in distilled water for 30 min was 1.7% of that in 1% (W/V) EDTA solution. The wastewater from biological laboratories usually contains the above-mentioned organic and inorganic materials. So the half-life of plasmid DNA during thermo-treatment could be longer than 2~4 min in practical situations, suggesting we must pay attention to this possibility.

Keywords thermo-treatment; plasmid DNA; decay; environmental factors; transformation; real-time PCR

1 引言 (Introduction)

随着现代生物技术的高速发展, 生物技术实验室和生产企业普遍使用和排放一些含有细菌病毒、生物毒素以及重组 DNA 和蛋白等活性物质的废弃

物 (废水), 由此产生了所谓的生物性污染物。这些生物性污染物质的排放可能会对生态环境产生一定的影响, 部分污染物质的危害可能十分严重。SARS 爆发后, 我国全面加强了生物实验室的安全管理和废弃物的处置, 并已采取了一系列相应措施

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 40571145, No. 40871217)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40571145, No. 40871217)

作者简介: 李梦南 (1984-), 男; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: celwang@yahoo.com

Biography LIM engnan (1984-), 男; * **Corresponding author**, E-mail: celwang@yahoo.com

(卢英方等, 2003). 对于固体生物性废弃物的处置手段主要包括热处理法、化学消毒法和辐照法. 其中应用最为广泛的是热处理法, 而热处理法中的中热和高热处理法因技术要求较高、成本昂贵而没有得到大规模应用. 我国目前对于固体生物性废弃物仍采用处理温度在 93~177°C 的低热处理法. 分子生物学、医学和微生物学各类实验室的固体废弃物会在 130 kPa 121°C 条件下维持 20 min 来杀灭微生物(陈扬等, 2005). 但是, 对于含有生物性污染物的废水由于体积庞大, 通常只做一般的预处理后就排放下水道. 目前, 对于存在于生物实验室废水中的废弃重组质粒 DNA 的排放可能造成的生态危害尚未引起足够重视.

游离的 DNA 可以在生态环境中存在相当长的时间. 有研究表明, 胞外 DNA 可以通过阳离子架桥作用附着到土壤矿物质和腐殖酸上, 并有可能转移到感受态细菌内并进入微生物的 DNA 循环 (Levy-Brooth *et al.*, 2007). 同时, 用 PCR 和 Southern 杂交的方法也证明了微宇宙中胞外的游离 DNA 可以保持很长时间不被降解 (Nielsen *et al.*, 2007). 为此, 李梦南等 (2007) 提出了生物实验室废弃的重组 DNA 也是一种生物性污染物, 其向自然环境的排放有可能导致基因转移, 进而危害生态系统基因库的多样性. 上海市科委与环保局的联合调查显示 (2006), 目前上海市生物实验室产生的固体生物性废弃物往往有专门的回收和处置途径, 而实验室的生物性废水通常只经过 100°C 煮沸 3~5 min 后排放下水道, 或无任何预处理措施而直接排放. 李梦南、王磊等 (2008) 的研究已证实, 目前常用的针对生物实验室废水的 100°C 热处理过程难以彻底消解、破坏水中废弃的重组质粒 DNA, 热处理质粒 DNA 的降解半衰期约为 2.7~4 min, 即使热处理 60 min 其仍具有一定的生物活性.

但是, 上述热降解实验主要在纯水中进行的, 而生物实验室废水成分复杂, 往往含有多种有机物和无机离子或存在一些其他极端环境条件. 有关调查也显示 (上海市科委, 环保局 2006), 生物实验室废水中除了含有废弃的重组 DNA 片段外, 往往还含有其他一些废弃生化试剂, 如 EDTA、血清蛋白、NaCl 等. 这些因子的存在可能会进一步影响热处理对质粒 DNA 消解、破坏效率.

因此, 本文以重组质粒 pET-28b 为实验材料, 以定量 PCR 技术结合 DNA 转化为手段, 研究了

pH、NaCl 浓度、牛血清白蛋白 (BSA) 浓度及 EDTA 浓度对废弃重组质粒 DNA 热处理效率的影响. 旨在了解热处理过程中这些环境因素 (如 pH、无机离子、废水中的其他有机物质等) 对质粒 DNA 降解的影响, 为评价热处理含重组质粒 DNA 废水的有效性 与安全性提供参考.

2 实验材料与方法 (Materials and methods)

2.1 质粒、菌种和培养基及质粒 DNA 的制备

质粒: pET-28b 质粒的制备与浓度检测参考李梦南 (2008) 的方法. 本次实验制备的质粒 DNA 浓度为 $4.4 \times 10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 经计算拷贝数为 $7.6 \times 10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.2 NaCl 梯度热处理

将浓度为 $10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 分别用质量分数为 0%、0.01%、0.05%、0.1% 的 NaCl 溶液稀释到 $10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (自然 pH = 7.0 左右). 沸水浴加热 30 min, 然后置于 20°C 常温放置 30 min, 最后置于 0°C 冰浴备用.

2.3 BSA 梯度热处理

将浓度为 $10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 分别用质量分数为 0%、0.01%、0.05%、0.1% 的 BSA 溶液稀释到 $10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (自然 pH = 7.0). 沸水浴加热 30 min, 然后置于 20°C 常温放置 30 min, 最后置于 0°C 冰浴备用.

2.4 EDTA 梯度热处理

将浓度为 $10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 分别用浓度为质量分数为 0%、0.01%、0.05%、0.1% 的 EDTA 溶液稀释到 $10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (pH = 6.8). 沸水浴加热 30 min, 然后置于 20°C 常温放置 30 min, 最后置于 0°C 冰浴备用.

2.5 pH 梯度热处理

将浓度为 $10^{10} \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 溶液分别用 pH 为 4 的 HCl 溶液和 pH 为 7.9 的 NaOH 溶液稀释到 $10^9 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 沸水浴加热 30 min, 然后置于 20°C 常温放置 30 min, 最后置于 0°C 冰浴备用.

2.6 质粒 DNA 的转化活性以及热处理过程中质粒 DNA 降解率检测

根据李梦南等 (2008) 的方法进行质粒 DNA 的转化活性及热处理过程中质粒 DNA 降解率的检测.

2.7 定量 PCR 扩增

质粒 pET-28b 中特异性片段的定量扩增方法参考李梦南等 (2008) 的方法.

3 结果 (Results)

3.1 NaCl、BSA、EDTA 对质粒 DNA 热降解效率的影响

NaCl 是生物实验室最常用的化学试剂, 必然会出现在生物实验室的废弃物 (废水) 中, 是无机离子的代表. DNA 由磷酸、碱基、脱氧核糖组成, 由于磷酸在 DNA 骨架的外侧, 是极性物质, 能溶于水中, 而不易溶于水的碱基则在 DNA 骨架的内侧, 因此, DNA 能溶于水且能溶于 NaCl 溶液 (Rau *et al.*, 1984).

以双蒸水稀释的质粒 DNA 样品沸水加热 30 min 的转化子数作为标准, 计算不同浓度 NaCl 溶液稀释后的样品经 30 min 热处理后的质粒相对转化效率, 结果见图 1. 由图可以看出, 不同 NaCl 浓度下的质粒 DNA 样品经热处理 30 min 后的相对转化效率有较大的差异, 随着 NaCl 浓度的增加, 热处理后质粒 DNA 的相对转化效率也有相应的增加. 而对照实验表明, 未热处理的质粒 DNA 在不同 NaCl 质量分数下的转化结果没有显著的差异 (具体结果未列).

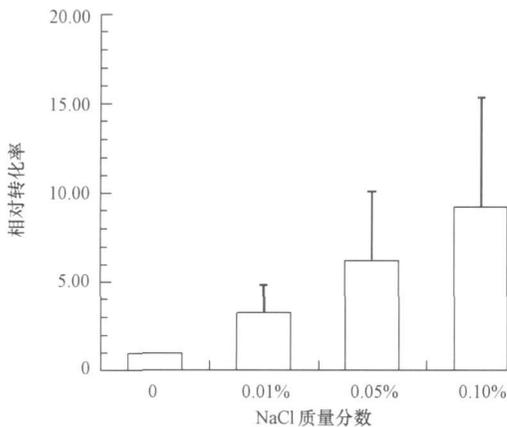


图 1 不同 NaCl 质量分数条件下加热 30 min 后质粒 DNA 的相对转化率

Fig. 1 The transformation efficiency of plasmid DNA pET-28b under different ionic strength conditions

为进一步说明 NaCl 对质粒 DNA 热处理效率的影响, 对 NaCl 离子强度梯度下热处理 30 min 后的质粒样品经乙醇沉淀后 (去除 NaCl 以减少离子强度对 PCR 的结果的影响) 进行定量 PCR 分析 (见图 2a). 结果显示, 废水热处理过程中离子强度较高的情况下, 残留的未破坏的质粒 pET-28b 中的特异性片段较多, 这表明降解效率有所下降. 当质粒 DNA 在质量分数为 0.1% 的 NaCl 溶液中进行热处理, 未被降解的质粒 pET-28 可扩增片段数目与在纯水中

进行热处理相差了 1 个数量级.

牛血清白蛋白 (BSA) 是常用的生物化学试剂, 起着减少 PCR 管对 Taq 酶的吸附作用、稳定酶活性及保护作用; 大部分内切酶几乎都在保存液中添加有 $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的 BSA, BSA 有改善 PCR 结果和稳定低浓度核酸的作用, 因此, BSA 在生物实验室的废水中普遍存在.

对 BSA 浓度梯度下热处理 30 min 后的质粒样品经乙醇沉淀后 (去除一部分蛋白) 进行定量 PCR 分析 (图 2b). 结果显示, 水溶液中的 BSA 对质粒 DNA 的保护作用较之 NaCl 更为显著, 在纯水中热处理 30 min 后质粒 pET-28b 的特异性可扩增片段数目只是在 0.1% 的 BSA 中热处理的质粒 DNA 的可扩增片段数目的 1.9%.

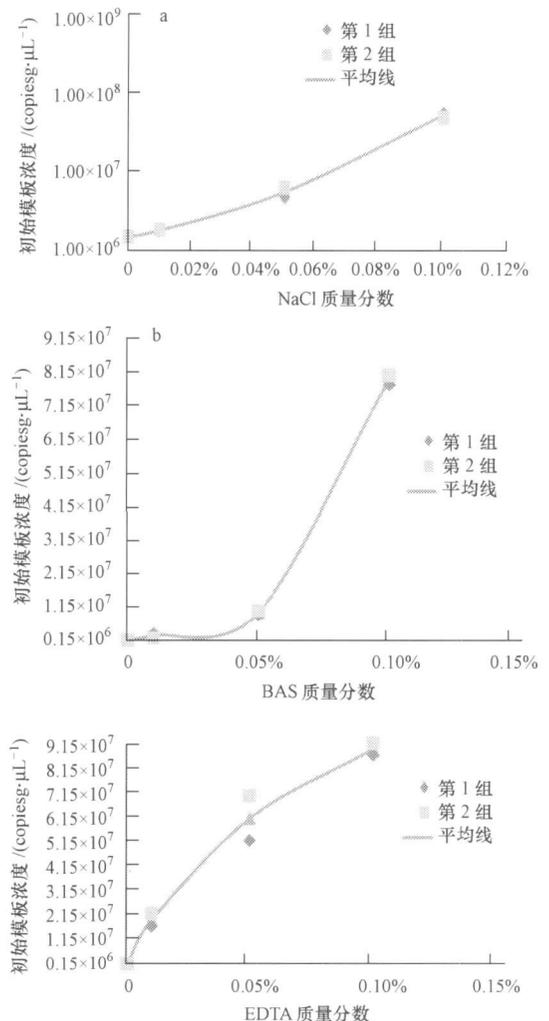


图 2 质粒 DNA 在不同 NaCl、BSA、EDTA 质量分数条件下热处理 30 min 后的质粒可扩增片段浓度

Fig. 2 The changes in concentration of plasmid DNA pET-28b after heating for 30 min with different amounts of NaCl, BSA and EDTA added

EDTA 是一种重要的络合剂,能和碱金属、稀土元素及过渡金属等形成稳定的水溶性络合物.在质粒 DNA 的分离、转化和鉴定实验中,EDTA 被广泛用于螯合二价金属离子,抑制 DNase 的活性,防止 DNA 降解.一般用来保存 DNA 的缓冲液中都添加了 EDTA,它与 DNA 在大多数情况下是同时存在的.

对 EDTA 浓度梯度下热处理 30min 后的质粒样品经乙醇沉淀后进行定量 PCR 分析(图 2c).结果显示,水溶液中 EDTA 对质粒 DNA 起到了很大的保护作用,在纯水中热处理 30min 后质粒 DNA 可扩增片段数目仅是在 0.1% 的 EDTA 中热处理 30min 后的可扩增片段数目的 1.7%.

3.2 pH 对废弃质粒 DNA 热降解的影响

以双蒸水稀释的质粒 DNA 样品沸水加热 30min 的转化子数作为标准,计算不同 pH 溶液稀释的样品经 30min 热处理后的质粒相对转化效率(不同 pH 热处理后的样品调回 pH = 7 后再进行转化),结果见图 3.由图可以看出,不同 pH 值条件下的质粒 DNA 样品经热处理 30min 后的相对转化效率有较大的差异. pH 值为 7 时残留的转化效率最高, pH 值为 9 时的转化效率仅为前者的 23%, pH 值为 4 时已基本无法得到转化子.

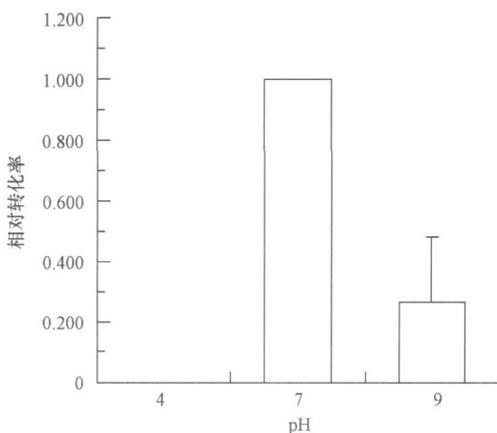


图 3 不同 pH 条件下加热 30min 后质粒 DNA 的相对转化率 (pH = 4 时,无法得到转化子)

Fig. 3 The transformation efficiency of plasmid DNA pET-28b under different pH conditions (the transformants cannot be obtained if pH is 4)

4 讨论 (Discussion)

4.1 NaCl、BSA 和 EDTA 对热处理过程中废弃质粒 DNA 结构与活性的保护作用

本研究结果表明,环境中的 NaCl、BSA 和 EDTA

浓度对热处理过程中的质粒 DNA 均具有一定的保护作用,使其在热处理过程中免受降解,从而使热处理后质粒的残留转化活性提高.

一般 DNA 在水中的溶解度随 NaCl 浓度的增加先减小(当氯化钠溶液浓度达到 0.14 mol L^{-1} 时达到最小值)然后再上升 (Weiskopf, 1977),为了排除溶解度的影响,本研究选取的 NaCl 浓度梯度均小于 0.14 mol L^{-1} . 较高的离子浓度有利于保护碱基之间的连接,随着 Na^+ 浓度的不断提高,溶液中的 Na^+ 会与 DNA 发生络合反应,络合反应的产物具有更高的稳定性,从而提高了 DNA 分子的热耐受性 (Stryer, 1999).

溶液中加入的 BSA 可以维持 DNA 结构的稳定.因为质粒 DNA 在 BSA 溶液中热处理时,质粒 DNA 会发生热变性,同时 BSA 也会发生变性,热变性使 BSA 分子表面疏基含量下降,分子之间发生缔合,表面疏水性下降;而且随着剧烈持久的热处理,导致 BSA 的热变性是不可逆的,这样就从某种程度上竞争性地保护了 DNA 受到不可逆的破坏 (Yun *et al.*, 2006).另外,值得注意的是,容器中的 DNA 一般会与容器的接触面发生反应,达到某种均衡. EP 管的材质首先可能吸附核酸,其次还可以诱导 DNA 的结构发生某些变化,如变性等.在 DNA 的浓度非常高时,这个现象可能观察不到;当 DNA 浓度较低时,加入 BSA 所产生的稳定核酸的效果就会比较明显,而 BSA 的存在抑制了 EP 材料对 DNA 的吸附以及由此诱导的结构变化,从而保护了 DNA 的结构.

EDTA 的主要作用在于抑制样品中的核酸酶对核酸的破坏;但在本研究中,其对 DNA 的保护作用可能是因为 EDTA 与 DNA 结合成某种配合物 (Kolover *et al.*, 1999),从而保持了 DNA 的稳定性.

4.2 pH 对热处理过程中质粒 DNA 结构与生物活性的影响

由于酸碱的使用,实验室的废弃溶液往往处于各种 pH 环境中, pH 对质粒 DNA 的降解有一定影响 (Weaver, 2000). DNA 分子在酸化作用下会发生 DNA 构型的转变,在 $\text{pH} \leq 3.6$ 酸化的条件下, DNA 分子开始发生质子化作用, AT 碱基对和 GC 碱基对发生氢键分离,当 $\text{pH} \leq 2.2$ 酸化时完全分离(不可逆).一般而言 RNA 在弱酸性更稳定,而 DNA 在弱碱性更稳定.而实验室排出的强酸碱往往会分开收

集,因此,这里我们仅研究弱酸碱条件对热处理质粒 DNA 的影响,故研究的 pH 变化范围在 4~9 之间 (Cristina *et al.*, 2005).

从试验结果来看,环境中的 pH 值对热处理过程中质粒 DNA 的降解具有一定的影响作用,酸性条件能加速其降解.这可能是因为 DNA 本身在酸性条件下会产生脱嘌呤作用,结合热处理的影响使其降解速率加快 (Lindah 1993).同时, DNA 的等电点为 4~4.5 也就是说 pH 在 4~4.5 之间溶解度最小 (Lewin, 2000), 这点可能也是在 pH 为 4 时质粒 DNA 的降解速率较快的原因之一.

5 结论 (Conclusions)

1)当质粒 DNA 在质量分数为 0.1% 的 NaCl 溶液中进行热处理,未被降解的质粒 pET-28 可扩增片段数目与在纯水中进行热处理相差了 1 个数量级.溶液中的 NaCl 使其在热处理过程中免受降解,进而具有较高的残留转化活性.这可能是由于较高的离子浓度有利于保护碱基之间的连接.

2)环境中的 BSA 溶液对热处理过程中的质粒 DNA 具有较强的保护作用,使其在热处理过程中免受降解,在纯水中热处理 30min 后质粒 DNA 的可扩增片段数目仅是在 0.1% BSA 中热处理的质粒 DNA 可扩增片段数目的 1.9%.

3)环境中的 EDTA 对热处理过程中的质粒 DNA 有很强的保护作用,在纯水中热处理 30min 后的质粒 DNA 可扩增片段数目仅是在 0.1% EDTA 中热处理 30min 后质粒 DNA 可扩增片段数目的 1.7%.

4)pH 值对热处理过程中质粒 DNA 的降解具有一定的影响作用,酸性条件能加速质粒 DNA 的降解和失活.

综上所述,由于生物实验室废水中通常含有上述有机或无机物质,因此实际热处理过程中质粒 DNA 的降解半衰期可能较长,残留的转化活性也可能更高,这一点必须引起我们高度关注.

参考文献 (References):

- 陈扬,王开宇,刘富强. 2005. 医疗废物非焚烧处理技术应用及发展趋势探讨 [J]. 环境保护, 7: 57—58
- Chen Y, Wang K Y, Liu F Q. 2005. Analysis on technological application and development trend of non-incineration technology for medical waste disposal [J]. Environmental Protection, 7: 57—58 (in Chinese)
- Muntean C M, Dost I L, Missewitz R, *et al.* 2005. DNA structure at low pH values in the presence of Mn^{2+} ions: a Raman study [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 36: 1047—1051
- Koltover I, Sakiit T, Safinaya C R. 1999. Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid-DNA self-assembled complexes [J]. Biophys J, 77: 915—924
- Levy-Booth D J, Campbell R G, Gulden R H, *et al.* 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment [J]. Soil Biology and Biochemistry, 39(12): 2977—2991
- Lewin B. 2000. Gene VII[M]. Oxford: Oxford University Press, 85—87
- Lindah T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA [J]. Nature, 362: 709—715
- 李梦南, 郑广宏, 王磊. 2007. 重组基因的生物安全问题及其对策 [J]. 环境与健康杂志, 12: 1007—1010
- Li M N, Zheng G H, Wang L. 2007. The safety problems and solutions of recombinant gene [J]. Journal of Environment and Health, 6: 1001—1007 (in Chinese)
- 李梦南, 郑广宏, 王磊. 2008. 重组质粒 DNA 在热处理过程中的降解变性规律研究 [J]. 环境科学学报, 28(5): 945—950
- Li M N, Zheng G H, Wang L. 2008. The decay/denaturation regulation of plasmid DNA during the thermo-treatment process [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 28(5): 945—950 (in Chinese)
- 卢英方, 任民, 许利峰. 2003. SARS 过后的思考——建设部关于建立医疗垃圾处理系统的调查报告 [J]. 建设科技, 9: 11—15
- Lu Y F, Ren M, Xu L F. 2003. Thinking after SARS—Investigation report by Ministry of Construction on the establishment of medical waste disposal system [J]. Technology of Construction, 9: 11—15 (in Chinese)
- Nielsen K M, Johnsen P J, Bensasson D, *et al.* 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment [J]. Environ Biosafety Res, 6: 37—53
- Rau D C, Lee B, Parsegian V A. 1984. Measurement of the repulsive force between polyelectrolyte molecules in ionic solution: hydration forces between parallel DNA double helices [J]. PNAS, 81: 2621—2625
- 上海市科学技术委员会. 2006. 上海市环境保护局. 上海市生物废弃物排放现状调研报告 [R]. 沪统审字 (2005) 07 号
- Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, Environmental Protection Bureau. 2006. Biological Waste Disposal Investigation Report of Shanghai [R]. Shanghai: The 7th Approval Order of Shanghai Statistics Bureau, 2005
- Stryer L. 1999. Biochemistry (5th ed) [M]. New York: W H, Freeman and Company, 476—477
- 王天宇, 赵治海, 阎洪波. 2001. 谷子抗除草剂基因从栽培种向其近缘野生种漂移的研究 [J]. 作物学报, 27(6): 681—687
- Wang T Y, Zhao Z H, Yan H B. 2001. Gene flow from cultivated herbicide-resistant foxtail millet to its wild relatives: a basis for risk assessment of the release of transgenic millet [J]. Acta Agronomica Sinica, 27(6): 681—687 (in Chinese)
- Weaver R F. 2000. Molecular Biology [M]. New York: McGraw-Hill Companies Inc, 1123—1124
- Weiskopf M, Li H J. 1977. Poly (L-lysine)-DNA interactions in NaCl solutions: B to C and B to psi transitions [J]. Biopolymers, 16(3): 669—684
- Wu Y, Sino J S, Sugiyama T, *et al.* 2006. The DNA binding preference of RAD52 and RAD59 proteins [J]. J Biol Chem, 281: 40001—40009